PAUTAS METODOLOGICAS PARA EL ESTUDIO DE POLYCYSTINA (PROTOZOA: RADIOLARIA)

DEMETRIO BOLTOVSKOY *

SUMMARY: **Methodological aspects of Polycystina (Protozoa: Radiolaria) research.**

Although the importance of Radiolaria from the biological point of view, as well as for paleontological purposes, has been thoroughly proved, no detailed accounts on the methodology used for their investigation have yet been available. Plankton samples should be taken with nets, rather than with pumps or bottles, and vertical tows should be performed with throttling devices, the mesh-aperture of the gauze being 0.03 to 0.06 mm. Extreme care should be taken to avoid contamination. Regular, non neutralized formaldehyde can be successfully used for the fixation of the samples; when cytological studies are the purpose of the collection, special fixation drugs and techniques should be used. Separation of the radiolarians from bulk-samples can be performed manually, with the aid of simple or mechanized pipettes; in this case studies of the living vs the dead fractions of the catch can be carried out by staining the organisms with Rose Bengal, Eosin, etc. Draining the sample through a filter-paper and picking the shells retained on the latter, or just mounting the filter-paper with the radiolarians on a slide, can also be done. When thorough identifications of the species are not necessary, regular phytoplankton and microzooplankton techniques, such as the Utermöhl, centrifugation, sedimentation chambers and holographic photography can be applied. The elimination of organic matter and non-shelled plankton from bulk-samples can be accomplished by ultraviolet-light treatments, or ashing the material in ovens or "plasma excitors". Ashes are sieved through a 0.035 to 0.060 mm mesh and mounted on slides with Canada balsam, "Caedax" or "Hyrax". Location of the specimens on the slides is determined with the aid of an "England Finder", and their illustrations obtained by means of light-photography and hand-drawings.

INTRODUCCION

Las primeras menciones de Radiolaria en la bibliografía biológica datan de principios del siglo XIX, y ya en 1887 Ernst Haeckel, en su monumental estudio de las colecciones de la expedición oceanográfica inglesa "Challenger", describió 3389 especies de estos protozoos. Sin embargo, pocos años más tarde el interés por Radiolaria sufrió un notable decremento: los escasos intentos de utilizar sus restos fósiles como indicadores estratigráficos resultaron estériles.

En los años 50 del presente siglo comenzaron a salir a luz los trabajos de Campbell, Lipman y Riedel demostrando la indudable utilidad de Polycystina como fósiles indicadores. Actualmente existen en el mundo entero alrededor de 70 especialistas en este grupo y su importancia no está ya en tela de juicio. En efecto, como indicadores estratigráficos, por ejemplo, han ganado un lugar preferencial entre los microfósiles debido, en gran parte, al hecho de no solubi-

* Ciudad Universitaria de Núñez. Ciencias Biológicas. 1428 Buenos Aires, Argentina, y Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas.

ISSN 0325-0342	P H Y S I S Sección A	Buenos Aires	v. 37	n. 93	pág. 33-41	noviembre 1977

lizarse debajo de las profundidades críticas donde ya no quedan restos calcáreos (*e.g.*, Foraminifera). Tanto es así que el programa internacional "Deep Sea Drilling Project" cuenta, en todos sus cruceros, con especialistas en Radiolaria y los informes correspondientes incluyen uno o más trabajos sobre el grupo.

Hay también otras circunstancias que hacen de los radiolarios un grupo zooplanctónico sumamente importante. En el aspecto paleontológico, además de ser útiles para los fines estratigráficos también lo son para la paleoecología. Esto último fue probado en más de una oportunidad por Hays (1965), Nigrini (1970), Casey (1970), y otros. Demás está decir que estos estudios tienen gran importancia en lo que se refiere al conocimiento de la paleodistribución de los continentes, el desplazamiento de los polos, la geología de numerosos yacimientos minerales de importancia económica, las teorías evolutivas, etc.

Desde el punto de vista biogeoquímico Radiolaria, conjuntamente con las diatomeas y, en menor medida, los silicoflagelados, son responsables de la circulación del sílice disuelto en el mar. Ellos no solamente contribuyen a eliminar del sistema los excesos de este material aportados por las aguas dulces, manteniendo el tenor normal de hipersubsaturación (Lisitzin, 1971), sino que son responsables de la formación de miles de kilómetros cuadrados de fondos sedimentarios y de rocas tales como los radiolaritos, ftanitas, jáspers, aleuropelitas, etc.

Las poblaciones vivientes de Radiolaria también tienen mucha importancia. Su influencia sobre la productividad primaria fue señalada por Khmeleva (1967), quien encontró que en algunas áreas oceánicas la producción de los fitoplanctontes de vida libre llega a ser 2 y hasta 3 veces más baja que aquella de las zooxantellas simbióticas en el citoplasma de algunos géneros de Radiolaria. Desde el punto de vista energético debe también destacarse la importancia de este grupo como nexo entre la sustancia orgánica muy finamente particulada o inclusive disuelta, y los consumidores secundarios menores (McMillen, 1976).

A pesar de la relevancia demostrada y que ha llevado a los EE.UU. y a varios países europeos a formar importantes cuadros de especialistas en el tema, América latina posee hasta el momento un solo biólogo dedicado al estudio de Radiolaria. Uno de los motivos de tal situación radica en que la metodología utilizada en este grupo es relativamente complicada. Además no existe en la bibliografía mundial un solo artículo dedicado a delinear las técnicas a seguir para la preparación de material planctónico virgen, y sólo algunos breves comentarios en lo que a muestras geológicas se refiere (*i.e.*, Strelkov, Khabakov y Lipman, 1959; Riedel y Sanfilippo, 1977).

La finalidad de esta nota es llenar el vacío mencionado en lo que a los radiolarios planctónicos recientes se refiere, con la esperanza de que, eventualmente, ayude a la orientación de los biólogos en formación hacia esta rama de la planctología.

OBTENCION DEL MATERIAL

Los instrumentos más comúnmente utilizados para la recolección de Radiolaria vivientes son las redes de plancton, cuyas características se definen de acuerdo con el estudio abordado (*e.g.*, lances horizontales, verticales u oblicuos). En vista de que la motilidad de estos organismos es prácticamente nula, no existen los problemas de evasión que se presentan al muestrear planctontes de mayor tamaño (ver, por ejemplo, Clutter y Anraku, 1968). Las redes pueden ser remolcadas lentamente y ser de boca pequeña. Sin embargo, en áreas con densidades bajas de organismos la utilización de redes mayores, con bocas de 1 metro de diámetro o aún más, son necesarias. Para los barridos verticales y/u oblicuos estratificados debe recurrirse a aparatos con sistemas de cierre y

apertura. En estos casos debe optarse por mecanismos de estrangulamiento como, por ejemplo, el que utiliza el disparador comercializado por "General Oceanics" (ver detalles de construcción, utilización y funcionamiento en Owre y Low, 1969), y no los de cierre por medio de tapas (tipo Clarke-Bumpus; Clarke y Bumpus, 1950; Paquette y Frolander, 1957) ya que estos últimos suelen cerrar imperfectamente, en cuyo caso el pequeño tamaño de Radiolaria puede hacer que éstos sigan penetrando por las fisuras provocando la contaminación entre horizontes. Ultimamente se ha estado ensayando la aplicación de redes grandes, de boca rectangular de 1 metro de lado, con mecanismos de apertura y cierre comandados acústicamente (Baker *et al.*, 1973).

Las ventajas de estos dispositivos, a saber, grandes volúmenes de agua filtrada, muy bajo porcentaje de fallas mecánicas, posibilidad de un control sumamente preciso de la profundidad muestreada, etc., parecen balancearse con dos desventajas de mucha importancia, a saber: el imperfecto cierre de la boca y el excesivamente alto costo de los equipos (S. A. Kling, comunicación personal).

El tipo de malla a utilizarse es aquel que oscila entre 0.06 y 0.05 mm de abertura de poro, para los estudios generales. En el caso de los análisis cuantitativos o de colección de la fauna de Radiolaria total, incluyendo los individuos juveniles y las especies de menor tamaño tales como, por ejemplo, *Lithomitra lineata*, las telas deben ser más cerradas, entre 0.03 y 0.04 mm. La gran desventaja de estas mallas tan finas es su rápida colmatación y consecuente error en los cálculos cuantitativos ulteriores. Las redes de hasta 0.1-0.12 mm y aún mayores, si bien inútiles para deducciones de índole numérica absoluta, suelen retener material de Radiolaria sumamente interesante que puede ser utilizado para el análisis de la fracción mayor de las poblaciones.

Uno de los problemas más graves en la recolección de Polycystina por medio de redes es el de la contaminación entre muestras; dado el tamaño de estos planctontes como así también debido a sus esqueletos espinosos, las posibilidades de quedar enganchados en la tela y ser liberados en un lance posterior son especialmente altas. Por ello se recomienda que, luego de cada lance, la red utilizada sea lavada muy cuidadosamente, restregando la tela entre las manos a fin de eliminar todo resto reconocible de sus mallas.

Las bombas de succión y las botellas son otros de los medios utilizables para el muestreo de los radiolarios. El pequeño tamaño de los organismos, su falta de movilidad y la presencia de un esqueleto rígido contribuyen a la obtención de resultados satisfactorios evitando el problema de la evasión y la destrucción del material. Sin embargo, también aquí existen algunos inconvenientes. En el caso de las bombas de succión éstos consisten en que los aparatos diseñados para tomar muestras de 100 a 200 m de profundidad, es decir, del nivel de mayor concentración de Radiolaria (Beers y Stewart, 1971; Petrushevskaya, 1971), son de construcción complicada y difícil operación. Además, al igual que las botellas. las bombas obtienen muestras relativamente pequeñas (en comparación con las de red) y, consecuentemente, pueden provocar serios errores de interpretación.

FIJACION Y PRESERVACION DE LAS MUESTRAS

La fijación normalmente se efectúa con formol (formaldehído en solución acuosa al 40 %) al 5-10 %. Este procedimiento es ideal para los estudios sistemáticos y distributivos generales, así como para los morfológicos-esqueletarios. El sílice amorfo, inorgánico, de los caparazones se conserva mejor en un medio levemente ácido (pH 5, 6); por eso es preferible no neutralizar el líquido fijador que, al entrar en contacto con las proteínas de los planctontes, reaccionará

liberando ácido fórmico (ver Steedman, 1976). Sin embargo, este procedimiento es altamente destructivo para todos aquellos organismos que cuentan con estructuras de carbonato de calcio (Foraminifera, Pteropoda). Por ello, cuando la muestra quiera conservarse intacta para el análisis de todos los grupos planctónicos, la preservación ideal es por congelamiento.

Cuando la finalidad de la colecta son los estudios especiales de tipo citológico u otros, la fijación también debe realizarse concordantemente, recurriendo a técnicas particulares tales como la del ácido ósmico, fijador de Bouin, etc.

Los integrantes de la familia Collosphaeridae (orden Spumellaria) son el único taxon colonial de Radiolaria; los individuos viven unidos entre sí por medio de una masa gelatinosa, generalmente alargada y de tamaño variable. Estas colonias son sumamente frágiles y se desagregan con gran facilidad, sobre todo luego de muertas y fijadas. Por ello es muy recomendable revisar la muestra recién tomada y separar estas colonias, una por una, en pequeños frascos individuales. La certeza de que un grupo de conchillas proviene del mismo ejemplar brinda un excelente medio para estudiar las variaciones intraespecíficas tan importantes en Radiolaria (ver más adelante).

PREPARACION DEL MATERIAL PARA SU ESTUDIO

La preparación de los ejemplares para el estudio puede realizarse de varias maneras.

SEPARACIÓN MANUAL

Es el sistema más lento y tedioso pero, al mismo tiempo, el más seguro, efectivo y preciso. Consiste en la aislación de los caparazones uno por uno, manualmente. Ello puede efectuarse de la muestra neta, sin tratamiento previo alguno. Si la muestra estaba congelada, se descongela y se reparte en cápsulas de Petri o recipientes similares, en capa delgada. En el caso de muestras fijadas con formaldehído, las emanaciones de la droga suelen ser sumamente molestas para el operador, y en los casos de personas especialmente alérgicas, las mucosas nasales y oculares pueden llegar a tal grado de irritación que se debe abandonar la tarea por completo. Estos síntomas aumentan con el tiempo y son más molestos cuanto más alta es la temperatura ambiente. Para evitar estos problemas el material puede transferirse a otra solución como, por ejemplo, una mezcla de 95 ml de agua de mar, 4.5 ml de glicol-propileno y 0.5 ml de fenoxetol-propileno (Steedman, 1976). Si la fijación en formaldehído fue suficientemente prolongada, el líquido descripto puede utilizarse permanentemente para almacenar la muestra.

La separación de los radiolarios se realiza con un pincel de punta fina o con una micropipeta. En el segundo caso puede aprovecharse el fenómeno capilar solamente o puede recurrirse a algún tipo de "automatización" del succionado. McMillen (1976) recomienda conectar un tubo de goma entre la pipeta y la boca del operador, quien aspira los ejemplares hacia el interior del tubo de vidrio. Algo más sofisticados son los modelos en los cuales la aspiración está dada por medio de una jeringa o de un motor eléctrico conectado con una bomba de vacío (Haller-Nielsen, 1950; Hamlin y Bé, 1963).

El conjunto de los Radiolaria obtenido en una muestra planctónica está representado por individuos vivos en el momento de la captura y por caparazones vacíos, en proceso de sedimentación. La separación manual es prácticamente el único sistema aplicable a aquellos estudios en que se desea discernir entre estas dos fracciones. Para ello el citoplasma de los organismos vivos se tiñe con algún

colorante como Rosa de Bengala (0.5 g por litro de líquido) o Eosina, de tal manera que éstos pueden distinguirse fácilmente.

Los ejemplares aislados pueden distribuirse en portamicrofósiles, pegándolos al fondo de cartón con una gota de goma arábiga (ver Boltovskoy y Wright, 1976), en portaobjetos de vidrio y montados en Bálsamo de Canadá u otros medios (ver más adelante), o en pequeñas cápsulas de vidrio, en medio líquido.

La engorrosa tarea de separar los radiolarios de una muestra total en medio acuoso puede ser facilitada si se elimina el líquido. Para ello se filtra el material a través de un papel de filtro y luego éste se seca en estufa. Los caparazones retenidos sobre la superficie del papel se manipulean con un pincel fino. Petrushevskaya (1966) asegura que los individuos con el citoplasma teñido con Eosina son distinguibles inclusive en este estado seco. Obviamente este procedimiento inutiliza la mayor parte restante de la muestra; por ello sólo puede aplicárselo a alícuotas del original separadas para el estudio de los radiolarios exclusivamente, o a muestras de las cuales ya se han separado los organismos que serían dañados por la deshidratación.

Filtración

Goll (comunicación personal) utiliza otra variante del método de la filtración anteriormente descripto que, según su experiencia, suele dar excelentes resultados con muestras sin material gelatinoso (*e.g.*, salpas, medusas, quetognatos), y en las cuales la proporción de Radiolaria es aceptablemente alta. Se arma un filtro tipo "Millipore" sobre un recipiente conectado con una bomba de succión y se vierte la muestra en el mismo. El material se lava con agua destilada varias veces y luego con soluciones alcohólicas en agua al 50, 75 y 90 %, y con alcohol puro. Seguidamente se retira y seca el filtro, se embebe con unas gotas de aceite de inmersión para microscopia para transparentarlo, se ubica sobre un portaobjetos y se monta el preparado con el medio "Permount" y un cubreobjetos sostenido en los cuatro ángulos con pequeños tacos de trozos de vidrio cubreobjetos. Según Goll, en estos preparados frecuentemente pueden distinguirse los ejemplares con citoplasma de los desprovistos de él.

Recuento Directo

La identificación de Radiolaria es, generalmente, una tarea difícil y que suele requerir la observación meticulosa y detallada de los caparazones, su iluminación desde diferentes ángulos, cambios de posición, etc. Por otro lado, la confección de preparados definitivos es generalmente necesaria para contar con la posibilidad de volver a las identificaciones y/o individuos de afinidad dudosa y, al mismo tiempo, poseer una permanente serie de referencia para el trabajo futuro. Sin embargo en algunos casos, sobre todo cuando la finalidad del estudio no incluye la determinación taxonómica detallada sino un recuento y/o observación de los taxa de categorías superiores, o si sólo se desea conocer la numerosidad de unas pocas especies fácilmente identificables, puede recurrirse al uso de algunas de las técnicas de recuento de fito y microzooplancton de uso general. Estos métodos no son específicos para Radiolaria ni de uso demasiado difundido en el estudio de este grupo, por ello sólo nos limitaremos a mencionarlos brevemente sin entrar en sus detalles:

a) Separación de una alícuota con pipeta graduada o con "Stempel pipette" y su observación y recuento en cápsulas de Petri o en portaobjetos excavados.

b) Utilización de alguna de las cámaras de recuento *ad hoc* (ver Kiselov, 1969).

c) Concentración del material por centrifugado y análisis del sedimento (ver Hartman, 1958).

d) Uso de cámaras de sedimentación y microscopio invertido (ver Utermöhl, 1931, 1958; Lund, 1951; Lovegrove, 1960; Dawson, 1960; Throndsen, 1970; Nauwerck, 1963; Tungate, 1967).

e) Recuentos sobre la base de imágenes holográficas.

Eliminación de la Materia Orgánica

Normalmente las muestras de plancton netas contienen una amplia variedad de organismos y Radiolaria; tanto en términos de cantidad de individuos como en biomasa, constituyen una baja proporción del total. Como ya se viera anteriormente, la labor que insume la separación de los radiolarios, uno por uno, es sumamente lenta y tediosa. Por ello, comúnmente se recurre a diferentes procedimientos que eliminan la mayor parte del material planctónico recogido. dejando intactos solamente algunos de sus componentes, entre ellos los caparazones de Polycystina. Lógicamente, en todos aquellos casos en los que la muestra en cuestión esté destinada al análisis de varios grupos planctónicos, éstos deben aislarse de antemano o conservarse en una submuestra *a priori*.

A) *Oxidación de la materia orgánica con luz ultravioleta.* El método fue originariamente propuesto por Holmes (1967) y utilizado por varios investigadores (*e.g.*, Renz, 1976). Las muestras fijadas con formaldehído se lavan con agua destilada y se centrifugan (para eliminar el sobrenadante) varias veces. Seguidamente se vierten en vasos de precipitado y se les agregan unas gotas de peróxido de hidrógeno; la reacción oxidativa así desencadenada se continúa bajo la acción de luz ultravioleta durante unas 12 horas. Según Renz *(op. cit.)* el método da buenos resultados y no destruye los caparazones de los crustáceos, que pueden conservarse para un estudio ulterior.

B) *Calcinamiento en mufla.* Si la muestra fuera muy rica en organismos de cuerpo blando (*e.g.*, Chaetognatha, Medusae, Salpidea, etc.), conviene previamente tratarla con peróxido de hidrógeno en caliente. Para ello a la muestra lavada y cubierta con agua destilada se agrega un 30 - 35 % de agua oxigenada en caliente ($\sim$ 90°C). Cuando cesa el burbujeo y el líquido se ha enfriado, la operación puede considerarse terminada. De las muestras lavadas (tratadas con peróxido de hidrógeno o no) se elimina la mayor cantidad posible de líquido sobrenadante y el material se vierte en cápsulas de porcelana y se seca en estufa a 70 - 80°C. Una vez secas, las cápsulas se pasan a una mufla. Sachs *et al.* (1964) recomiendan calcinar a unos 500°C durante 2 a 3 horas.

Debe tenerse en cuenta que la alta temperatura puede destruir la inscripción identificatoria en la cápsula utilizada; para evitar este inconveniente debe utilizarse un marcador de punta de diamante o anotar el orden de ubicación de los recipientes en la mufla.

Tanto el calentamiento como el enfriamento deben llevarse a cabo gradualmente; los cambios térmicos bruscos pueden provocar la rotura del recipiente y el resquebrajamiento de los ejemplares.

C) *Calcinamiento en frío.* Normalmente la alta temperatura no afecta las conchillas de Polycystina pero, eventualmente, los ejemplares recuperados de la mufla pueden aparecer deteriorados y opacos. En los últimos años algunos laboratorios comenzaron a utilizar aparatos especiales de calcinamiento en frío: son los denominados "Plasma Excitors", que dan mejores resultados que las muflas comunes (Goll, comunicación personal).

Eliminación del Material Calcáreo

Si bien es poco frecuente, suele sin embargo ocurrir que los caparazones de carbonato de calcio de los foraminíferos y moluscos planctónicos que, lógicamente,

no se queman en la mufla, sean suficientemente numerosos como para interferir en el análisis de Polycystina. En estos casos el material seco se diluye con agua y se mezcla con unas gotas de ácido clorhídrico concentrado. Si el agregado de una pequeña cantidad adicional de ácido no reinicia el burbujeo característico en la muestra, la disolución del carbonato de calcio presente puede considerarse terminada. Los remanentes de ácido se eliminan mediante varios lavados.

CONFECCION DE LOS PREPARADOS

El material remanente se ubica en un vaso de precipitado con agua. Generalmente las cenizas se agregan en cúmulos y grumos que deben fraccionarse finamente. Ello se logra tratando la muestra con un vibrador ultrasónico durante unos pocos segundos.

Una vez homogeneizado, el material debe ser filtrado a través de tamices. Si en la muestra hubiera fragmentos grandes se utiliza primero un tamiz de 0.35 a 0.40 mm y el líquido así filtrado vuelve a pasarse por otro tamiz de 0.06 mm (o de 0.035 - 0.040 mm si se desea conservar los individuos juveniles y las especies de menor tamaño) donde un lavado exhaustivo eliminará las partículas menores.

El material remanente se recoge con una pipeta (directamente del tamiz o de un recipiente al cual se transfiere con un poco de agua) y se distribuye en portaobjetos en una capa delgada. Estos portaobjetos debidamente rotulados con un lápiz de diamante se ubican sobre una platina caliente (60-70°C) hasta que el agua se evapore totalmente. Luego se retiran, la superficie con la muestra se lava con unas gotas de xileno haciendo escurrir la droga sobre la cara inclinada del portaobjetos, se depositan sobre ellos 1 -2 gotas de Bálsamo de Canadá y se cubren con un vidrio cubreobjetos. Otros medios de montaje que pueden dar resultados mejores con ejemplares especialmente delicados son los conocidos con los nombres comerciales de "Hyrax" y "Caedax".

ANALISIS DEL MATERIAL

Los preparados pueden revisarse inmediatamente luego de montarlos, pero es recomendable dejarlos en estufa a 65°C durante un par de días antes de cualquier manipuleo. Luego de ese tiempo ya pueden ser utilizados sin temor, aunque el secado definitivo no se completa hasta luego de varios meses. Su almacenamiento se efectúa en posición horizontal ya que el lento secado del medio de montaje provoca el desplazamiento de los caparazones en el seno del mismo, haciendo muy difícil la reubicación de los especímenes buscados.

La observación se realiza bajo microscopio; para los recuentos, aumentos de 100 a 150 x suelen ser adecuados, mientras que las identificaciones se efectúan con 500 y hasta más de 1000 x.

Es recomendable llevar registros de la ubicación, ya sea de todos los ejemplares observados o, al menos, de aquellos que se proyecta ilustrar, de los dc características morfológicas divergentes, los de identidad dudosa, etc. Para ello se utiliza el "England Finder" (Riedel y Foreman, 1961), un vidrio portaobjetos con retícula graduada con guías numéricas en el eje de las abscisas y alfabéticas en las ordenadas; las intersecciones correspondientes permiten la inmediata ubicación de cualquier punto exacto sobre el preparado.

El mejor método de ilustración se logra por medio de fotografías (el sistema "Polaroid" es especialmente recomendable por su rapidez y comodidad) ya que es el único que brinda una imagen comparable con aquella que aparece en

el microscopio óptico. En algunos casos, sobre todo cuando se trata de ilustrar, en la misma fotografía, detalles estructurales ubicados en dos planos focales diferentes, puede recurrirse a la doble exposición de la misma película, obteniendo ambas imágenes con diferentes detalles en foco, superpuestas.

La ilustración manual también es muy aconsejable como proceso paralelo al fotografiado, ya que no sólo obliga al investigador a detenerse y notar características que de otra manera podría haber pasado por alto, sino que permite la presentación de detalles y profundidad no registrables en la fotografía óptica.

El microscopio electrónico de barrido, utilizado por algunos investigadores, tiene la desventaja de que, en la mayoría de los casos, la imagen que brinda tiene un aspecto totalmente diferente a la que da el microscopio óptico (ya que en este último caso, por transparencia se observan estructuras que el primero no registra). Sin embargo, su utilidad es incuestionable para algunos estudios morfológicos detallados.

En todos los casos las referencias a las ilustraciones incluidas en un manuscrito a publicar deben detallar la identificación de la muestra, el número de preparado correspondiente (si hubiera más de uno por muestra), la ubicación del ejemplar en el anterior de acuerdo con las coordenadas del "England Finder" y, lógicamente, el aumento utilizado (ver, por ejemplo, Boltovskoy y Riedel, en prensa).

Sólo unas pocas especies de Polycystina son suficientemente conocidas como para que su identidad sea satisfactoriamente transmitida con el nombre científico solo; en la gran mayoría de los casos la ilustración y la lista sinonímica correspondientes son la única manera efectiva de definir el taxón que se menciona.

BIBLIOGRAFIA

Baker, A. de C.; Clarke, M. R. y Harris, M., 1973. The NIO combination net (RMT 1 + 8) and further developments of rectangular midwater trawls. *J. Mar. Biol. Ass. U. K.* 53 (2): 167-184.

Beers, J. R. y Stewart, G. L., 1971. Micro-zooplankters in the plankton of the upper waters of the Eastern Tropical Pacific. *Deep-Sea Res. 18* (19): 861-883.

Boltovskoy, D. y Riedel, W. R., Polycystine Radiolaria from the Southwestern Atlantic Ocean plankton. *Micropaleontology*. En prensa.

Boltovskoy, E. y Wright, R., 1976. Recent Foraminifera. Junk, The Hague, pp. 1-515.

Casey, R. E., 1970. Paleotemperature analysis based on radiolarian ratios. *Geol. Soc. Am. Ann. Meet. 1970, Abstracts*, pp. 736-738.

Clarke, G. L. y Bumpus, D.F., 1950. The plankton sampler - an instrument for quantitative plankton investigations. *Spec. Publs. Am. Soc. Limnol. Oceanogr.* 5, 8 pp.

Clutter, R. L. y Anraku, M., 1968. Avoidance of samplers. *Zooplankton sampling, (D. J. Tranter, Ed.)*, Unesco, París, pp. 57-76.

Dawson, W. A., 1960. Home-made counting chambers for the inverted microscope. *Limnol. Oceanogr. 5* (2): 235-236.

Haeckel, E., 1887. Report on the Radiolaria collected by H. M. S. "Challenger" during the years 1873-1876. *Repts Voy. Challenger, Zool. 18*, pp. i-clxxxiii + 1-1803.

Haller-Nielsen, P., 1950. An auxiliary apparatus for plankton studies by means of the sedimentation method. *J. Cons. Intern. Explor. Mer. 16* (3): 307-309.

Hamlin, W. H. y Bé, A. W. H., 1963. A plankton-picker. *Deep-Sea Res. 10:* 459-461.

Hartman, R. T., 1958. Studies of plankton centrifuge efficiency. *Ecology* 39 (2): 374-376.

Hays, J. D., 1965. Radiolaria and late Tertiary and Quaternary history of Antarctic Seas. *Biol. Ant. Seas II, Am. Geophys. Un., Ant. Res. Ser.* 5, pp. 125-184.

Holmes, R. W., 1967. The dissolution of protoplasm in thecate dinoflagellates by ultraviolet induced oxidation. *Stain Technol. 42* (1): 34-35.

Khmeleva, N. N., 1967. Role of radiolarians in the estimation of the primary production in the Red Sea and the Gulf of Aden. *Dokl. Akad. Nauk SSSR. 172:* 1430-1433.

Kiselov, I. A., 1969. Plankton morei i kontinentalnikh vodoyomov. *Nauka*, Moskva, pp. 1-658.

Lisitzin, A. P., 1971. Distribution of siliceous microfossils in suspension and in bottom

sediments. *The micropaleontology of oceans (B. M. Funnell y W. R. Riedel, Eds.)*, Cambridge Univ. Press, London, pp. 173-195.

LOVEGROVE, T., 1960. An improved form of sedimentation apparatus for use with an inverted microscope. *J. Cons. Intern. Explor. Mer.* 25 (3): 279-284.

LUND, J. W. G., 1951. Sedimentation technique for counting algae and other organisms. *Hydrobiologia 3:* 390-394.

MCMILLEN, K. J., 1976. Ecology, distribution and preservation of polycystine Radiolaria in the Gulf of Mexico and Caribbean Sea. Ph. D. Thes. diss., Rice Univ., pp. 1-122.

NAUWERCK, A., 1963. Die Beziehungen zwischen Zooplankton und Phytoplankton im See Erken. *Symb. bot. upsal. 17* (5): 1-163.

NIGRINI, C. A., 1970. Radiolarian assemblages in the North Pacific and their application to a study of Quaternary sediments in core V20-130. *Geol. Soc. Am. Mem. 126*, pp. 139-175.

OWRE, H. B. y LOW, J. K., 1969. Methods of collecting net plankton from a series of known depths through the water column. *Bull. Mar. Sci. 19* (4): 911-921.

PAQUETTE, R. G. y FROLANDER, H. F., 1957. Improvements in the Clarke-Bumpus plankton sampler. *J. Cons. Intern. Explor. Mer.* 22 (3): 284-288.

PETRUSHEVSKAYA, M. G., 1966. Radiolarii v planktone i v donnikh osadkakh. *Geokhimia kremnezema, Nauka,* Moskva, pp. 219-245.

— 1971. Spumellarian and Nassellarian Radiolaria in the plankton and bottom sediments of the Central Pacific. *The Micropaleontology of oceans (B. M. Funnell y W. R. Riedel, Eds.)*, Cambridge Univ. Press, London, pp. 309-318.

RENZ, G. W., 1976. The distribution and ecology of Radiolaria in the Central Pacific plankton and surface sediments. *Scripps Inst. Oceanogr. Bull.* 22, pp. 1-267.

RIEDEL, W. R. y FOREMAN, H. P., 1961. Type specimens of North American Paleozoic Radiolaria. *J. Paleontol.* 35 (3): 628-632.

RIEDEL, W. R. y SANFILIPPO, A., 1977. A Cenozoic Radiolaria. *Oceanic Micropaleontology* (A. T. S. Ramsay, Ed.), vol. 2, Acad. Press, pp. 847-912.

SACHS, K. N.; CIFELLI, R. y BOWEN, V. T., 1964. Ignition to concentrate shelled organisms in plankton samples. *Deep-Sea Res. 11* (4): 621-623.

STEEDMAN, H. F. (Ed.), 1970. Zooplankton fixation and preservation. Unesco, París.

STRELKOV, A. A.; KHABAKOV, A. V. y LIPMAN, R. KH., 1959. Podklass radiolarii ili lucheviki. *Osnovi Paleontologii* (Yu. Orlov, Ed.), *Akad. Nauk. SSSR*, Moskva, pp. 369-482.

THRONDSEN, J., 1970. A small sedimentation chamber for use on the Wild M40 and the Zeiss plankton microscopes. *J. Cons. Intern. Explor. Mer.* 33 (3): 297-298.

TUNGATE, D. S., 1967. A new sedimentation chamber. *J. Cons. Intern. Explor. Mer. 31* (2): 284-285.

UTERMÖHL, H., 1931. Uber das umgekehne Mikroskop. *Arch. Hydrobiol. Plankt. 22:* 643-645.

— 1958. Zur Vervollkommnung der quantitativen phytoplankton-methodik. *Mitt. intern. Ver. Limnol. 9:* 1-38.